

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Perikanan Fakultas Pertanian–
Pternakan (FPP) serta Laboratorium Kimia UMM pada bulan Mei – Juni 2017.

3.2. Materi dan Alat

3.2.1. Materi

Tabel 3. Materi dan fungsi yang dipakai dalam kegiatan penelitian

Materi	Fungsi
Benih ikan lele	Hewan uji dalam penelitian
Daun kersen	Bahan utama dalam pembuatan ekstrak
Etanol 96%	Pelarut daun kersen
Air tawar	Pencuci daun kersen serta media tempat hewan uji hidup
Akuades	Bahan pelarut dan pengenceran
Ikan nila	Sumber ektoparasit <i>Trichodina sp.</i> yang akan di jangkitkan pada benih ikan lele
Ikan mas	Sumber ektoparasit <i>Trichodina sp.</i> yang akan di jangkitkan pada benih ikan lele
Pakan benih ikan lele FF999	Pemberi nutrisi bagi benih ikan lele yang di uji
Ekstrak daun kersen	Obat alami
FeCl ₃ 1%	Uji tanin
CH ₃ COOH	Uji steroid atau terpenoid
H ₂ SO ₄	Uji steroid atau terpenoid
HCl 2 N	Uji alkaloid dan uji saponin
Filtrat ekstrak daun kersen	Uji alkaloid
Pereaksi Mayer	Uji alkaloid
Pereaksi Bouchardat	Uji alkaloid
Pereaksi Dragendrof	Uji alkaloid
Air panas	Uji saponin
HCl pekat	Uji flavonoid
Serbuk Mg	Uji flavonoid
Amil alkohol	Uji flavonoid
pH <i>universal</i>	Uji derajat keasaman pada media penelitian
NaCl fisiologis	Uji prevalensi

3.2.2. Alat

Tabel 4. Alat dan fungsi yang dipakai dalam kegiatan penelitian

Alat	Fungsi
Akuarium 40x20x25 cm	Wadah penelitian
Timbangan	Menimbang kebutuhan bahan
Cover glass	Penutup objek yang akan di uji pada objek <i>glass</i> serta untuk mengambil sampel lendir dengan metode <i>scrapping</i>
Saringan mesh 18	Menyaring atau mengayak daun kersen yang telah di blender
Kertas saring kasar	Memisahkan hasil maserasi dengan filtrat serta menyaring filtrat yang akan digunakan untuk uji alkaloid
rotary evaporator IKA® HB 10	Proses evaporasi ekstrak etanol daun kersen
oven memmert UN 55	Mengeringkan daun kersen
Erlenmeyer 250 ml	Wadah pengenceran dan penampung larutan
Beaker glass 1000 ml	Wadah penampung larutan atau akuades
Labu takar 100 ml	Membuat larutan dengan konsentrasi tertentu
Spatula	Mengaduk daun kersen yang dimaserasi dalam alkohol 96%
Pipet ukur	Mengukur larutan
Ball pipet	Menghisap larutan agar masuk kedalam pipet ukur
Blender	Menghaluskan daun kersen
Timbangan analitik	Menimbang bobot benih ikan lele
Blower resun LP 40	Memberi suplai oksigen terlarut dalam air
Air stone ASC 89031	Pemberat selang aerasi dan pemecah oksigen
Kran aerasi	Mengatur besar kecilnya oksigen yang keluar
Selang aerasi	Pengalir dan penyalur oksigen
Pipa paralon ½ dim	Penyalur oksigen
Lampu LED 7 watt	Penerangan
Bak kecil	Merendam benih lele yang diobati
Tutup pipa	Menutup ujung pipa yang terbuka
Termometer	Mengukur suhu air
Toples beling	Wadah proses maserasi

3.3. Batasan Variabel dan Cara Pengamatan

Variabel yang diamati dalam penelitian sebagai berikut :

- a) Daun kersen (*Muntingia calabura*) merupakan tumbuhan yang banyak tumbuh di sekitar jalan, memiliki kandungan senyawa bioaktif diantaranya senyawa

flavonoid, saponin, triterpen, steroid dan tannin. Antioksidan terbaik adalah pada bagian daun (Kuntorini dkk, 2013). Daun kersen yang digunakan adalah daun kersen muda yang terletak pada 7 ruas awal dari bagian ranting yang berwarna hijau gelap pada bagian atas dan berwarna hijau terang pada bagian bawah.

- b) Ekstraksi merupakan suatu metode pemisahan senyawa dari campurannya dengan menggunakan pelarut atau metode penarikan kandungan senyawa kimia metabolit sekunder dari bagian tumbuhan dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Sutomo dkk, 2015). Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan etanol 96%, pelarut ini dapat menghasilkan kadar total senyawa flavonoid lebih banyak dibanding dengan etanol 70% dan air (Nirwana dkk, 2011).
- c) Ikan lele adalah ikan air tawar yang termasuk salah satu dari enam komoditas yang akan dipacu pengembangan budidayanya dengan tujuan peningkatan produksi budidaya (Madinawati dkk, 2011). Benih ikan lele yang digunakan berukuran panjang 7 cm dengan bobot rata-rata 3,3 g.
- d) Gejala klinis merupakan perubahan yang diamati pada suatu objek penelitian karena terdapat kelainan pada organ luar, organ dalam ataupun perubahan tingkah laku (Sarjito, 2013). Gejala klinis yang ditimbulkan karena serangan ektoparasit *Trichodina sp.* diantaranya berenang tidak normal, keseimbangan terganggu, iritasi pada kulit, terdapat bintik putih pada bagian tubuh, kepala dan punggung, warna tubuh pucat, mengeluarkan banyak lendir serta hilangnya nafsu makan (Khordi, 2010).

- e) Prevalensi adalah persentase jumlah individu dalam suatu populasi yang terjangkit penyakit. Perhitungan prevalensi dilakukan dengan menghitung jumlah ikan sampel yang terserang dibagi jumlah ikan sampel yang diperiksa dikalikan dengan 100% (Pujiastuti dan Setiati, 2015).
- f) Sintasan adalah persentase tingkat kelulushidupan suatu individu. Perhitungan sintasan dilakukan dengan menghitung jumlah ikan uji yang hidup pada akhir percobaan dibagi dengan jumlah ikan uji yang hidup pada awal percobaan dikali 100% (Mambrasar dkk, 2015).
- g) Parameter kualitas air yang diukur dalam penelitian ini adalah pH, DO (*Dissolved Oxygen*) dan suhu.

3.4. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode ini pada umumnya digunakan pada penelitian yang bersifat laboratoris, dilakukan dengan memberikan *treatment* atau perlakuan terhadap subjek penelitian, kemudian diamati dan diukur dampaknya (Jaedun, 2011).

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 kali ulangan. Sehingga diketahui keefektifan pemberian ekstrak daun kersen dalam proses pengobatan benih ikan lele yang terserang penyakit *Trichodiniasis*. Model yang digunakan adalah : $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$ dengan perhitungan jumlah ulangan : $t(r-1) \geq 15 \rightarrow 5(r-1) \geq 15 \rightarrow 5r \geq 20 \rightarrow r \geq 4$. Selanjutnya dilakukan analisis varian (ANAVA), apabila terdapat perbedaan keefektifan antar perlakuan maka dilakukan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf nyata 5%.

Keterangan :

Y_{ij} : Nilai parameter utama akibat perlakuan ke-i

μ : nilai rata-rata (nilai tengah)

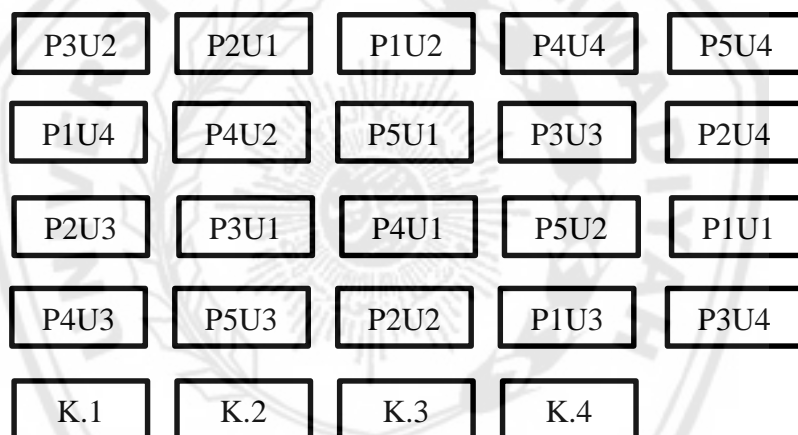
τ_i : efek perlakuan ke-i

ϵ_{ij} : efek kesalahan perlakuan akibat perlakuan ke- J

t : perlakuan penelitian

r : ulangan penelitian

Denah penelitian yang diacak agar tiap kolom dan baris tidak terdapat kesamaan perlakuan terdapat pada gambar 4.



P3U2	P2U1	P1U2	P4U4	P5U4
P1U4	P4U2	P5U1	P3U3	P2U4
P2U3	P3U1	P4U1	P5U2	P1U1
P4U3	P5U3	P2U2	P1U3	P3U4
K.1	K.2	K.3	K.4	

Gambar 4. Denah Penelitian
(Data Primer, 2017)

Keterangan :

P : Perlakuan

U : Ulangan

K : Kontrol Positif

P1 : Pemberian konsentrasi ekstrak daun kersen 1% atau 10.000 ppm

P2 : Pemberian konsentrasi ekstrak daun kersen 2% atau 20.000 ppm

P3 : Pemberian konsentrasi ekstrak daun kersen 3% atau 30.000 ppm

P4 : Pemberian konsentrasi ekstrak daun kersen 4% atau 40.000 ppm

P5 : Pemberian konsentrasi ekstrak daun kersen 5% atau 50.000 ppm

Menurut Syabatini (2008) konversi dosis dari persentase ke dosis ppm ini didapat dari perhitungan :

$$\mu_{(\text{ppm})} = 10.000 \times \mu_{(\%)}$$

Keterangan :

$\mu_{(\text{ppm})}$: Dosis dalam satuan ppm

$\mu_{(\%)}$: Dosis dalam satuan persen

10.000 : Ketetapan

3.5. Tahapan Penelitian

3.5.1. Pembuatan Ekstrak Daun Kersen

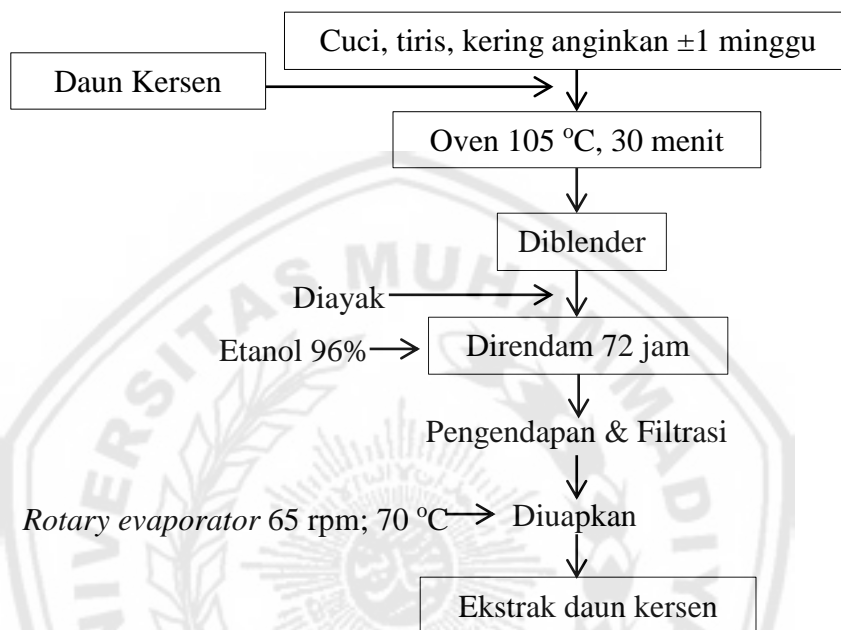
Pembuatan ekstrak daun kersen mengacu pada penelitian Andalia dkk (2017) yaitu sebagai berikut :

- a) Sebanyak 4500 g daun kersen yang akan diekstraksi dibersihkan terlebih dahulu dengan cara mencuci daun kersen di bawah air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun, lalu dikering anginkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung selama ± 1 minggu, untuk mengurangi kadar air pada daun kersen maka perlu dilakukan proses pengeringan dengan oven pada suhu 105 °C selama 30 menit.
- b) Daun kersen yang kering dihaluskan dengan blender dan diayak agar ukuran remahan daun kersen seragam. Hasil remahan daun kersen yang didapat sebanyak 1250 g.
- c) Remahan daun kersen diekstraksi dengan metode maserasi yaitu perendaman dengan etanol 96% selama 72 jam dimana perbandingan antara ekstrak dan

etanol 96% adalah 1:4 yaitu 1 kg remahan daun kersen dilarutkan dalam 4 liter etanol 96%.

d) Setelah proses maserasi semua ekstrak di saring dengan kertas saring.

e) Ekstrak etanol daun kersen diuapkan dengan *rotary evaporator* 65 rpm 70 °C.



Gambar 5. Diagram Alir Pembuatan Ekstrak Daun Kersen
(Data Primer, 2017)

3.5.2. Pengujian Fitokimia Ekstrak Daun Kersen

Menurut Sentat dan Pangestu (2016) untuk mengetahui kandungan yang terdapat pada ekstrak daun kersen maka diperlukan uji fitokimia yang sesuai prosedur Materia Medika Indonesia, dengan tahapan sebagai berikut :

1) Tanin

Sepuluh tetes ekstrak masukkan dalam tabung reaksi, tambah 1 sampai 2 tetes larutan FeCl_3 1%. Warna biru tua atau hijau kehitaman menandakan adanya tanin.

2) Steroid/Terpenoid

Empat puluh ml ekstrak, tambah 10 tetes CH_3COOH dan 2 tetes H_2SO_4 . Larutan di kocok dan biarkan selama beberapa menit. Steroid memberikan warna biru atau hijau, terpenoid memberikan warna merah atau ungu.

3) Alkaloid

Sepuluh tetes ekstrak masukkan dalam tabung reaksi, tambah 1 ml HCl 2 N dan 9 ml air suling, panaskan 2 menit, saring dengan kertas saring sehingga didapat filtrat. Filtrat yang didapat gunakan untuk percobaan: 3 tetes filtrat, tambah 2 tetes pereaksi Mayer menghasilkan endapan kuning/putih. 3 tetes filtrat, tambah 2 tetes pereaksi Bouchardat menghasilkan endapan coklat-hitam. 3 tetes filtrat, tambah 2 tetes pereaksi Dragendrof menghasilkan endapan merah bata. Alkaloid positif jika terjadi endapan paling sedikit 2 atau 3 dari percobaan tersebut.

4) Saponin

Sepuluh tetes ekstrak masukkan dalam tabung reaksi, tambah 10 ml air panas dan dikocok selama 15 menit, tambahkan 1 sampai 2 tetes HCl 2 N. Jika terbentuk busa permanen memberikan indikasi adanya saponin.

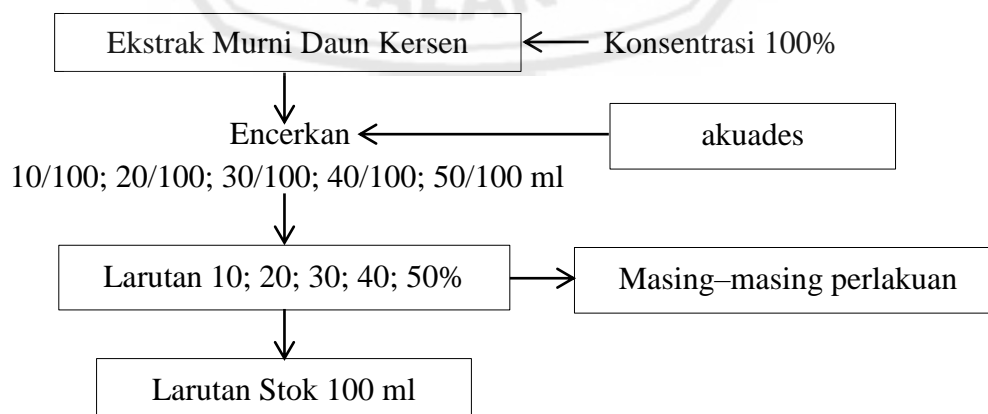
5) Flavonoid

Sepuluh tetes ekstrak etanol daun kersen dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambah 1 ml HCl pekat, 0,1 g serbuk Mg dan 2 ml amil alkohol lalu dikocok. Warna merah, jingga atau kuning yang terbentuk menandakan adanya flavonoid.

3.5.3. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak murni daun kersen hasil dari proses evaporasi dengan konsentrasi 100% di buat larutan stok untuk masing–masing perlakuan dengan cara sebagai berikut :

- a) Ekstrak murni daun kersen (konsentrasi 100%) diencerkan dengan akuades agar didapat larutan stok.
- b) Larutan stok pertama (perlakuan 1) dibuat dengan cara mengencerkan 10 ml ekstrak daun kersen dalam 100 ml akuades, larutan stok kedua (perlakuan 2) dibuat dengan cara mengencerkan 20 ml ekstrak daun kersen dalam 100 ml akuades, larutan stok ketiga (perlakuan 3) dibuat dengan cara mengencerkan 30 ml ekstrak daun kersen dalam 100 ml akuades, larutan stok keempat (perlakuan 4) dibuat dengan cara mengencerkan 40 ml ekstrak daun kersen dalam 100 ml akuades dan larutan stok kelima (perlakuan 5) dibuat dengan cara mengencerkan 50 ml ekstrak daun kersen dalam 100 ml akuades.
- c) Larutan stok yang dibuat memiliki konsentrasi 10%; 20%; 30%; 40%; 50%.
- d) Larutan stok ini dibuat untuk masing–masing perlakuan.



Gambar 6. Diagram Alir Pembuatan Larutan Uji
(Data Primer, 2017)

3.5.4. Persiapan dan Pengecekan Parasit Uji

Persiapan parasit uji dilakukan dengan metode *co-culture* yaitu ketika 2 jenis sel disatukan dan ditumbuhkan pada 1 media yang sama di laboratorium (Kook dkk, 2017). Sedangkan pengecekan parasit uji dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis, tahapan persiapan dan pengecekan parasit uji, sebagai berikut:

- a) Menaruh ikan nila serta ikan mas yang terdapat parasit *Trichodina sp.* pada bagian sisik dan lendir pada wadah kolam terpal bundar diameter ½ meter yang telah disiapkan.
- b) ikan nila dan ikan mas yang sakit dibiakkan pada media air dengan kualitas yang buruk, kemudian taruh benih ikan lele yang sehat kedalam media air yang telah disiapkan
- c) Buat padat tebar tinggi agar benih ikan lele cepat terinfeksi *Trichodina sp.*
- d) Biarkan selama 48 jam pada kisaran suhu 20–29 °C karena suhu ini adalah suhu optimum untuk pertumbuhan *Trichodina sp.* (Lestari, 2011).
- e) Setelah 48 jam cek keberadaan *Trichodina sp.* secara makroskopis yaitu dengan mengamati tingkah laku dan kondisi tubuh benih ikan lele.
- f) Kemudian amati secara mikroskopis yaitu dengan mengambil lendir yang ada pada tubuh benih ikan lele menggunakan *cover glass*.
- g) Lendir diambil dengan cara *scrapping* yang agak kuat, lalu taruh sampel yang akan diamati pada objek *glass concave* dan beri NaCl fisiologis.
- h) Amati pada mikroskop dengan perbesaran 450 kali.

- i) Benih ikan lele yang telah terjangkit *Trichodina sp.* dimasukkan kedalam wadah uji berupa akuarium dan di isi dengan jumlah 10 ikan perakuarium.

3.5.5. Persiapan Wadah Uji

Penelitian menggunakan akuarium sebanyak 24 buah dengan ukuran 40cm x 20cm x 25cm sebagai wadah uji. Setiap wadah dan peralatan yang digunakan seperti selang aerasi, batu aerasi dan serok dibersihkan dahulu, serta media air yang digunakan untuk ikan uji diendapkan terlebih dahulu selama 24 jam.

3.5.6. Uji Prevalensi Sebelum Pengobatan dengan Ekstrak Daun Kersen

Sebelum benih ikan lele diobati dengan ekstrak daun kersen perlu dilakukan terlebih dahulu pengujian prevalensi agar diketahui perubahan jumlah ikan yang terjangkit parasit *Trichodina sp.* antara sebelum (pra) serta setelah (pasca) pengobatan. Uji prevalensi benih ikan lele yang terinfeksi *Trichodina sp.* dilakukan pada hari ke-7 masa penelitian dengan memeriksa benih ikan lele yang telah ditebar pada 24 akuarium, dimana jumlah benih ikan lele perakuarium sebanyak 10 ekor dengan rata-rata ukuran panjang 7 cm dan rata-rata bobot 3,3 g. Sejumlah 240 sampel benih ikan lele diperiksa di Laboratorium Perikanan UMM dengan menggunakan mikroskop model L-301 perbesaran 450 kali. Pemeriksaan parasit dilakukan dengan mengambil lendir yang ada pada tubuh benih ikan lele menggunakan metode *scrapping* yang agak kuat. Menurut Pujiastuti dan Setiati (2015) persentase prevalensi dihitung dengan rumus :

$$\text{prevalensi} = \frac{\text{jumlah ikan sampel yang terserang}}{\text{jumlah ikan sampel yang diperiksa}} \times 100\%$$

3.5.7. Perendaman (*Dipping*) Ikan Uji pada Ekstrak Daun Kersen

Pengobatan benih ikan lele yang terjangkit *Trichodina sp.* dilakukan dengan metode perendaman (*dipping*). Tahapan pengobatan dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu:

- a) Ikan yang terinfeksi parasit *Trichodina sp.* diobati dengan ekstrak daun kersen melalui 2 tahap.
- b) Tahap pertama perendaman dilakukan pada hari ke-8 setelah 7 hari masa pemeliharaan dalam akuarium dan media pemeliharaan.
- c) Benih ikan lele direndam menggunakan ekstrak daun kersen dengan konsentrasi yang berbeda sesuai perlakuan.
- d) 20 wadah perendaman diisi dengan 900 ml air bersih.
- e) Lakukan pemajanan larutan uji dengan konsentrasi 10%; 20%; 30%; 40%; 50% berturut-turut ke wadah perendaman
- f) Pemajanan dilakukan melalui dinding wadah dengan volume 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi perlakuan 1%; 2%; 3%; 4%; 5%.
- g) Pada tiap konsentrasi perlakuan dilakukan 5 kali tahap perendaman, dimana dalam 1 tahap perendaman direndam sebanyak 2 ekor benih ikan lele.
- h) Waktu perendaman dilakukan selama 8 menit pada masing-masing tahap perlakuan (Indriani dkk, 2014).
- i) Tahap kedua perendaman dilakukan pada hari ke-15 setelah 7 hari masa pemeliharaan dalam akuarium dan media pemeliharaan.
- j) Tahapan perlakuan perendaman kedua sama seperti tahapan perendaman yang dilakukan pertama.

k) Lakukan pemeliharaan ketiga hingga hari ke-21 penelitian agar mengetahui perubahan yang terjadi.

3.5.8. Uji Prevalensi Setelah Pengobatan dengan Ekstrak Daun Kersen

Setelah proses pengobatan sebanyak 2 kali yang dilakukan pada hari ke-8 dan hari ke-15 penelitian, kemudian dilakukan kembali pengujian prevalensi pada benih ikan lele di hari ke-21 masa penelitian agar diketahui perubahan jumlah benih ikan lele yang terjangkit parasit *Trichodina sp.*, sampel benih ikan lele diperiksa di Laboratorium Perikanan UMM dengan menggunakan mikroskop model L-301 perbesaran 450 kali. Pemeriksaan parasit dilakukan dengan mengambil lendir yang ada pada tubuh benih ikan lele menggunakan metode *scrapping* yang agak kuat. Menurut Pujiastuti dan Setiati (2015) persentase prevalensi dihitung dengan rumus :

$$\text{prevalensi} = \frac{\text{jumlah ikan sampel yang terserang}}{\text{jumlah ikan sampel yang diperiksa}} \times 100\%$$

3.5.9. Perhitungan Sintasan

Perhitungan sintasan dilakukan pada hari ke-21 masa penelitian dengan mencatat jumlah benih ikan lele yang mampu bertahan hidup selama proses pemeliharaan dan penelitian. Menurut Mambrasar dkk (2015) sintasan dihitung dengan rumus :

$$Sr = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan :

Sr : tingkat kelangsungan hidup (%)

Nt : jumlah benih ikan lele yang hidup pada akhir percobaan

N_0 : jumlah benih ikan lele yang ditebar pada awal percobaan

3.6. Parameter Pengamatan

3.6.1. Parameter Utama

1. Prevalensi

Prevalensi adalah persentase jumlah individu dalam suatu populasi yang terjangkit penyakit. Perhitungan prevalensi dilakukan dengan menghitung jumlah ikan sampel yang terserang dibagi jumlah ikan sampel yang diperiksa dikalikan dengan 100% (Pujiastuti dan Setiati, 2015). Berikut rumus prevalensi :

$$\text{prevalensi} = \frac{\text{jumlah ikan sampel yang terserang}}{\text{jumlah ikan sampel yang diperiksa}} \times 100\%$$

2. Sintasan

Sintasan adalah persentase tingkat kelulushidupan suatu individu. Perhitungan sintasan dilakukan dengan menghitung jumlah ikan uji yang hidup pada akhir percobaan dibagi dengan jumlah ikan uji yang hidup pada awal percobaan dikali 100% (Mambrasar dkk, 2015). Berikut rumus sintasan :

$$Sr = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

3.6.2. Parameter Penunjang

1. Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan dengan mengamati perubahan warna kulit, kerusakan atau terdapat luka pada sirip serta perubahan pergerakan benih ikan lele yang terserang *Trichodina sp.*

2. Kualitas Air

Selama proses penelitian dilakukan pengukuran kualitas air dua kali sehari yaitu pada pagi hari pukul 08.00 serta sore hari pada pukul 16.00 WIB dengan parameter kualitas air yang diukur adalah suhu, pH dan DO.

3.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengujian parameter utama (prevalensi dan sintasan) dianalisis dengan analisis keragaman ANAVA (*Analysis of Variants*) menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Apabila terdapat perbedaan keefektifan pada tiap perlakuan dilakukan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf nyata 5%. Data penelitian diolah menggunakan Microsoft Excel© 2010.

